



Modern Technique of Clinical Experiment



现代 临床实验 研究技术

主编 刘民培

清华大学出版社

现代临床实验研究技术

刘民培 主 编

清华大学出版社
北京

内 容 简 介

本书作者结合自身从事临床实验研究多年来积累的经验,对当前国内外临床实验研究的有关技术作了全面系统的介绍,其内容丰富新颖,实用性强。

全书主要包括临床实验研究概论、细胞培养技术、细胞生物学技术、免疫学技术、生物化学技术、分子生物学技术、放射性核素实验技术、临床药理实验技术、实验肿瘤研究技术、实验动物技术、电子显微镜技术、流式细胞技术、基因诊断技术、基因治疗技术、生物芯片技术和医用纳米技术等 16 个方面的内容,在每个方面又含几种至数十种不等的相关技术。这些技术既反映了当前国内外在开展临床实验研究的水平,也涵盖了其有关的操作方法。

该书对广大医务工作者在进行临床实验研究有很大指导参考价值;对基础医学研究、医药专业和生物技术等科研及技术人员也有较大参考作用。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

图书在版编目(CIP)数据

现代临床实验研究技术/刘民培主编. —北京:清华大学出版社,2008.4
ISBN 978-7-302-15667-3

I. 现… II. 刘… III. ①临床医学—医学检验 ②实验室诊断 IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 103378 号

责任编辑:张建平

封面设计:色朗图文

责任校对:焦丽丽

责任印制:何 芊

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座

<http://www.tup.com.cn>

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, c-service@tup.tsinghua.edu.cn

质 量 反 馈:010-62772015, zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn

印 刷 者:北京季蜂印刷有限公司

装 订 者:北京市密云县京文制本装订厂

经 销:全国新华书店

开 本:185×260 印 张:53.75 字 数:1712 千字

版 次:2008 年 4 月第 1 版 印 次:2008 年 4 月第 1 次印刷

印 数:1~2500

定 价:128.00 元

本书如存在文字不清、漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量问题,请与清华大学出版社出版部联系调换。联系电话:(010)62770177 转 3103 产品编号:009076-01

编者名单

主 编	刘民培			
副 主 编	郭晓钟	李亚东		
编 委	(按姓氏笔画为序)			
	王春梅	李文欣	李亚雄	常雅萍
	樊 毅	薛洪利		
编 者	(按姓氏笔画为序)			
	万薇薇	于 华	于笑难	马 北
	马世英	尹艳慧	王 阳	王 迪
	王 洋	王永鹏	王承利	冯思哲
	田 笑	任丽楠	刘 皓	刘光军
	刘彦琴	曲爱兵	何 莉	宋连生
	宋洪涛	张连仲	张静蕊	李 欣
	李 慧	李兴华	李铁英	杜迎春
	杨 婧	杨家骥	邹爱东	陈 伟
	陈宪英	周 凡	周 蕾	孟凡军
	岳 辉	武彩虹	苗志林	侯晓娜
	姜志明	荣耀星	赵明宏	夏明钰
	徐建华	秦 勇	秦海明	郭 涛
	崔忠敏	曹永革	黄 梅	黄晓峰
	傅炜昕	潘冬生		

F

OREWORD

前言

前言

前言

临床实验研究既是标志医院现代化水平的重要内容和有关考核的指标之一，也是其综合实力及其素质的一种体现。目前，在国际上与临床研究有关杂志的影响因子（impact factor）有的已超过一些与基础研究有关的杂志，其中《柳叶刀》（The Lancet）的已高达15以上。在临床实验研究中，各种有关的技术不仅是实现和达到其研究目的不可缺少的部分，而且是过河之桥。

目前，我国从事临床的科技人员大约占卫生系统科技人员总数的70%以上。这些人员在肩负着繁重临床工作的同时，也希望结合自己遇到的问题开展前沿课题的研究。这种对新知识及新技术等的追求和渴望，是广大临床医务人员期盼其工作与国际临床医学接轨的一种夙愿，也是对当代医学发展理念的关注。

当前，在我国不仅开展临床科研等方面的基础比较薄弱，而且由于其方法的落后，研究水平很难与基础医学研究相比；有些临床医师，特别是一些新毕业的年轻医师在进行临床实验研究时，既对许多先进的方法缺乏了解和不会用，而且至今也无一本关于临床实验研究方面的专门书籍可供参考。为此，根据这一实际需要，为了让更多的临床医生学会其科研方法和技术，我们组织有关临床工作的科技人员共同编写了这本《现代临床实验研究技术》。

本书包括16章，基本概括了目前在临床实验研究中比较常用的有关操作技术。在编写的过程中，力求做到新颖全面、突出实用、操作性强等。而且，我们的初衷是力争为进行临床实验研究的同事提供一本既有一定的基本技术原理，更具有实际指导价值的参考书。同时综合国内外近年来的有关新进展，结合自己的有关研究经验作为抛砖之举，期望国内的临床工作者推出更好的精品，以便为推动中国临床医学的全面发展贡献一份力量。

在本书的编写过程中，得到了许多同道的热心支持和大力帮助。

参与编写的专家在百忙的临床及各自的工作中,认真撰稿,并不断地修改完善。在此,对这些关心、支持和厚爱此书同仁,特别是清华大学出版社的领导和同志们为本书出版的努力及贡献表示深切而衷心的感谢!

现代临床实验研究技术的发展十分迅速,有些概念、理论和方法等也在不断更新,新的技术也不断出现,加之本人的水平所限,难免有些不妥、遗漏,甚至错误的地方,祈望各位读者和同道不吝指正。

刘民培

2008年1月于沈阳军区总医院

C ONTENTS

目 录

第一章 临床实验研究概论	(1)
第一节 现代医学与临床实验研究	(1)
一、现代医学观念的特征	(1)
二、现代医学的特点及展望	(2)
三、临床实验研究面临的挑战	(4)
第二节 临床实验研究的主要范畴和分类	(8)
一、基础性研究	(8)
二、应用性研究	(9)
三、开发性研究	(9)
第三节 临床实验研究的基本程序	(10)
一、选题	(10)
二、设计	(10)
三、可行性研究报告	(11)
四、开题论证报告	(12)
五、科研实践	(13)
六、统计学分析	(14)
七、总结概括	(14)
第四节 研究课题的选题与立项	(14)
一、选题的原则	(15)
二、选题的来源	(16)

三、选题的方法和技巧	(18)
四、选题的基本程序	(19)
五、课题项目的申报或立项	(20)
第五节 临床实验研究的实验设计	(24)
一、实验设计的基本要素	(24)
二、实验设计的一般原则	(25)
三、常用的实验设计方法	(30)
第六节 临床实验研究论文的写作	(31)
一、写作的目的和意义	(31)
二、写作的基本要求	(32)
三、写作的一般步骤	(32)
四、论文的分类及其格式与写作方法	(34)
五、表格和图的制作法	(42)
六、英文摘要的写作	(45)
七、论文的发表	(49)
第七节 科研成果奖励的申报与鉴定	(52)
一、科学技术奖励的种类	(52)
二、科学技术奖励申请的程序	(54)
第八节 专利申请	(55)
一、概述	(55)
二、专利申请的基本程序	(57)
三、外国专利申请	(60)
四、专利代理机构和代理人	(61)
五、专利诉讼	(61)
六、专利战略	(62)
第二章 细胞培养技术	(65)
第一节 概述	(65)
一、细胞培养的一些基本概念	(65)

二、培养细胞的生长状态及特性	(67)
三、原代细胞培养	(68)
四、传代细胞培养	(68)
五、培养细胞的液体更换	(69)
六、细胞的冻存、复苏和运输	(69)
第二节 细胞培养的设备与准备	(70)
一、基本设备	(70)
二、器具洗刷	(72)
三、消毒和灭菌	(74)
第三节 细胞培养的条件及要求	(75)
一、培养液的基本要求	(75)
二、血清与天然培养物	(77)
三、环境	(80)
第四节 培养细胞增殖能力的测定	(81)
一、活细胞计数法	(81)
二、细胞生长曲线法	(82)
三、分裂指数计算法	(82)
四、克隆生成测定法	(83)
五、MTT 比色法	(83)
六、放射性物质掺入法	(84)
七、非放射性标记物 Brd U 的体外及体内掺入法	(84)
第五节 细胞培养中的有关问题	(86)
一、污染问题	(86)
二、污染的处理	(88)
三、滋养细胞的问题	(89)
第六节 细胞的分离	(90)
一、机械分散法	(90)
二、酶消化法	(90)

三、螯合剂分散法	(90)
四、淋巴细胞分离法	(91)
五、巨噬细胞的分离法	(91)
第七节 正常细胞的培养	(91)
一、上皮细胞的培养	(91)
二、皮肤成纤维细胞的培养	(96)
三、人支气管平滑肌细胞的培养	(97)
四、鸡胚心肌细胞的培养	(98)
五、血管内皮细胞的培养	(98)
六、微血管内皮细胞的培养	(99)
七、平滑肌细胞的培养	(102)
八、软骨细胞的培养	(103)
九、滑膜细胞的培养	(103)
十、羊水细胞的培养	(104)
十一、绒毛细胞的培养	(105)
十二、神经细胞的培养	(105)
第八节 免疫细胞的培养	(106)
一、LAK 的培养	(106)
二、TIL 的制备	(107)
三、CIK 细胞的无血清培养法	(108)
四、胸腺上皮细胞的培养	(108)
五、树突细胞的培养	(109)
六、巨噬细胞的培养	(110)
七、肥大细胞的培养	(110)
第九节 肿瘤细胞的培养	(112)
一、主要技术	(112)

二、生物学特性的检测	(113)
三、体外培养细胞的转化法	(114)
四、肿瘤细胞侵袭与转移的检测方法	(117)
五、体外药物敏感性实验	(119)
第十节 器官培养技术	(121)
一、概述	(121)
二、器官培养的方法	(121)
三、血管的器官培养	(127)
四、肝脏的器官培养	(127)
五、胃肠黏膜的器官培养	(128)
六、骨的器官培养	(128)
七、全胚胎培养	(129)
第十一节 干细胞的培养	(130)
一、胚胎干细胞	(130)
二、造血干细胞的培养	(131)
三、间充质干细胞	(137)
四、神经干细胞	(140)
五、胰岛干细胞	(144)
六、表皮组织干细胞	(144)
七、肿瘤干细胞	(145)
第三章 细胞生物学技术	(151)
第一节 概述	(151)
第二节 细胞遗传学研究技术	(151)
一、概述	(151)
二、染色体标本的制作	(152)
三、人染色体分带技术	(153)

四、小鼠染色体 C 分带技术	(157)
五、荧光原位杂交 (FISH) 法	(158)
第三节 细胞器的分离测定技术	(161)
一、细胞核的分离与鉴定	(161)
二、线粒体的分离与鉴定	(162)
三、高尔基器的分离与鉴定	(163)
四、细胞膜的分离与鉴定	(164)
五、内质网的分离与鉴定	(165)
第四节 细胞的生物学标记	(166)
一、核酸的标记方法	(166)
二、 ^{125}I 标记蛋白	(168)
三、免疫组织化学中使用的标记法	(170)
第五节 激光共聚焦显微镜细胞分析技术	(171)
一、概述	(171)
二、荧光染色法	(174)
三、反射光像的制作方法	(174)
四、共焦点图像与透射光图像的合成	(175)
五、连续图像及立体图像的制作	(175)
第六节 细胞凋亡的研究	(175)
一、概述	(175)
二、细胞凋亡的检测方法	(177)
三、细胞凋亡的生物化学分析法	(181)
四、细胞凋亡诱导方法	(183)
第七节 细胞自噬的研究	(184)
一、概述	(184)
二、自噬的检测方法	(186)

第四章 免疫学技术	(189)
第一节 概述	(189)
第二节 非特异免疫功能的测定	(190)
一、单核-巨噬细胞的分离与功能测定	(190)
二、中性粒细胞的功能测定	(192)
三、NK 细胞的功能测定	(193)
四、树突状细胞的分离及鉴定	(194)
五、补体的测定方法	(195)
六、溶菌酶的测定	(197)
第三节 细胞因子测定技术	(197)
一、概述	(197)
二、白细胞介素的测定技术	(199)
三、肿瘤坏死因子测定	(204)
四、集落刺激因子检测	(204)
五、干扰素检测	(206)
六、趋化因子检测	(207)
七、干细胞因子的检测	(208)
八、表皮生长因子的检测	(208)
九、神经生长因子检测	(208)
十、血小板衍生长因子检测	(209)
十一、成纤维细胞生长因子检测	(209)
十二、血管内皮细胞生长因子的检测	(209)
十三、转化生长因子 β 的检测	(210)
十四、白血病抑制因子检测	(210)
十五、胰岛素样生长因子检测	(210)
第四节 抗原的制备	(211)
一、抗原的提取	(211)

二、抗原的分离与纯化	(212)
三、纯化抗原的鉴定	(213)
第五节 多克隆抗体的制备	(214)
一、动物的选择	(214)
二、免疫原	(214)
三、佐剂	(215)
四、免疫途径	(215)
五、免疫血清效价的测定	(216)
六、采血及血清分离	(216)
七、抗体的纯化	(217)
八、免疫血清的保存	(218)
第六节 IgY 抗体的制备	(218)
一、概述	(218)
二、制备方法	(220)
三、IgY 抗体的鉴定分析	(220)
第七节 单克隆抗体制备	(221)
一、基本原理	(221)
二、制备过程	(221)
第八节 基因工程抗体	(225)
一、抗体分子及其基因结构	(226)
二、基因工程抗体的种类	(226)
第九节 双特异性抗体	(228)
一、概述	(228)
二、双链抗体的制备	(229)
三、其他双特异性抗体的制备策略	(236)
四、表达与鉴定	(236)

五、常见问题的处理	(238)
第十节 免疫扩散技术	(238)
一、单向免疫扩散	(238)
二、双向免疫扩散	(239)
三、逆向免疫扩散技术	(239)
第十一节 免疫电泳技术	(240)
一、微量免疫电泳	(240)
二、免疫固定电泳	(241)
三、对流免疫电泳	(242)
四、交叉免疫电泳	(243)
第十二节 免疫酶技术	(244)
一、间接 ELISA 法	(244)
二、双抗体夹心 ELISA 法	(245)
三、竞争 ELISA 法	(245)
第十三节 免疫荧光技术	(246)
第十四节 免疫微球技术	(247)
一、微球的分类	(247)
二、微球的致敏法	(248)
三、胶乳微球免疫检测法	(248)
四、免疫磁性微球法	(250)
五、脂质体微球检测技术	(252)
第十五节 发光免疫分析技术	(254)
一、概述	(254)
二、化学发光免疫分析法	(255)
三、生物发光免疫分析法	(256)
四、电化学发光免疫分析法	(257)
五、微粒子化学发光	(257)

第十六节 免疫组织(细胞)化学技术	(258)
一、原理及应用	(258)
二、实验流程	(258)
三、免疫酶细胞化学技术	(260)
四、免疫荧光组织化学染色	(262)
五、亲合组织化学技术	(263)
六、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶免疫组化染色技术	(265)
七、免疫金(银)细胞组织化学技术	(266)
八、免疫胶体铁组织化学技术	(267)
第十七节 免疫沉淀技术	(268)
一、细胞的裂解法	(268)
二、裂解物的预处理	(271)
三、免疫复合物的纯化	(271)
第十八节 免疫细胞检测技术	(273)
一、免疫细胞分离技术	(273)
二、免疫细胞数量及亚群测定	(275)
三、免疫细胞功能测定	(276)
四、细胞毒活性检测技术	(281)
第五章 生物化学技术	(287)
第一节 概述	(287)
第二节 蛋白质分离纯化	(288)
一、样品的处理	(288)
二、蛋白质的分级沉淀法	(289)
三、脱盐	(291)
四、浓缩	(292)
五、单克隆抗体的辛酸-硫酸铵纯化法	(293)

第三节 蛋白质含量测定	(294)
一、紫外光吸收法	(294)
二、福林-酚法	(294)
三、染料结合比色法	(295)
四、胶体金法	(296)
第四节 蛋白质分子量的测定	(296)
一、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(296)
二、凝胶过滤法	(300)
第五节 蛋白质的纯度分析	(301)
一、高效液相层析技术	(301)
二、高效毛细管电泳	(308)
三、液相层析-质谱联用技术	(315)
第六节 电泳实验技术	(317)
一、PAGE	(318)
二、SDS-PAGE	(321)
三、等电聚焦电泳	(321)
四、免疫电泳	(325)
五、双向电泳	(325)
第七节 层析技术	(328)
一、凝胶过滤层析法	(328)
二、离子交换层析法	(332)
三、亲和层析	(336)
四、疏水性相互作用层析	(339)
五、吸附层析	(340)
六、纸层析	(342)
第六章 分子生物学技术	(345)
第一节 概述	(345)
一、基本概念及其内容	(345)